

革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化试剂盒(过柱法)

Gram-Positive Bacteria Plasmid DNA Purification Kit

CAT#:BN24642

常温运输和保存,有低温成分

产品及特点

本试剂盒用于从革兰氏阳性 (G+) 细菌中小量制备质粒 DNA。本产品是经过精心改良后的碱变性法质粒 DNA 纯化试剂盒,其原理是菌体经溶菌酶破壁,将破壁后的菌体用碱使基因组 DNA 和质粒 DNA 全部变性,经酸中和后的质粒 DNA 可以快速复性,基因组 DNA 不能快速复性,通过离心可有效去除基因组 DNA。除去基因组 DNA 后的含质粒 DNA 的上清用离心吸附柱吸附质粒 DNA,洗去杂质,即可得到纯化的质粒 DNA。本产品具有如下特点:

1. 简单快捷,整个实验在 40 分钟左右完成。
2. 不需要预平衡离心吸附柱。
3. 通用洗柱液即开即用,不需要用户额外加乙醇。
4. 溶液 B 中有蓝色染料,便于目测非常关键的碱变性和中和反应两步的溶液混匀状况,保证实验效果。
5. 产量高,一次可以处理 1-4 mL 过夜培养的 G+菌液,每毫升过夜培养的 G+细菌可以提取到 2-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,纯化后质粒 DNA 的浓度取决于质粒的拷贝数。
6. 纯度高,采用本试剂盒提取的质粒 OD 比值在 1.8-2.0 之间,可以直接用于酶切、转化、测序及 PCR 等。
7. 本产品足够 50 次微量提取。
8. 本产品只可用于科研。

规格及成分	本产品使用大扁盒包装			
	成分	编号	规格	包装
	革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 A	20001	13 mL	15 mL 本色瓶
	革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 B	20002	13 mL	15 mL 棕色瓶
	革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 C	20003	18 mL	30 mL 本色瓶
	溶菌酶干粉 (20 KU/mg)	20004	250 mg	2 mL 黄盖管
	RNase A 溶液, 10 mg/mL	20005	0.6 mL	2 mL 本色管
	通用洗柱液	20006	50 mL	60 mL 本色瓶
	DNA 洗脱液 (基因组 DNA 专用)	20007	10 mL	10 mL 本色瓶
	离心吸附柱	20008	50 套	自封袋
	使用手册		1 份	无
运输及保存	常温运输和保存, RNase A 溶液需要-20℃保存, 溶菌酶干粉长期保存需要放-20℃, 有效期一年。			
自备物品	1.5 mL 塑料离心管。			
使用方法	1. 从筛选平板上挑取单菌落至含抗生素的培养基中, 37℃震荡培养 12-16 小时 (摇床转速 200-300)。注意: 建议使用 LB 培养基, 营养更丰富的培养基会使菌体浓度过高, 超过纯化系统的处理能力而降低质粒 DNA 的质量。另外, 延长培养时间会因细胞死亡、裂解而造成质粒 DNA 浓度降低。 2. 用 1.5 mL 离心管收集 1-4 mL 过夜培养饱和菌液, 室温 12,000 g 离心 1 分钟, 弃上清, 再短暂离心, 吸弃残留液体。 3. 第一次使用本试剂盒时, 先将本试剂盒提供的全部 RNase A 溶液加入到革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 A (简称溶液 A, 下同) 中, 摇匀后再取用, 未用完的溶液 A 放 4℃保存。 4. 加入 250 μL 溶液 A 到第 2 步得到的细菌沉淀中, 用枪头充分吹打使菌体重悬。注意: 细胞未充分悬浮会影响后续碱变性, 可以使用漩涡振荡器混匀或使用枪头吸头吹打沉淀至完全混匀。 5. 加入大约 5 mg 溶菌酶干粉到细菌悬液中 (用 0.1 mg 精度的分析天平称量), 轻柔颠倒混匀后室温放置 10 分钟破裂细胞壁。 6. 加入 250 μL 革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 B (下面简称溶液 B, 如			

本产品仅用于科研

TEL: 010-82422342 www.biorigin.Ltd

使用方法

果溶液 B 在低温放置产生沉淀，须 37℃ 加热溶解后冷却到室温方可使用），温和颠倒 4-6 次混匀，蓝色将变得均匀并且溶液将变得粘稠。注意：千万不要剧烈振荡，否则基因组 DNA 断裂产生的片段非常容易污染质粒 DNA。溶液 B 用后需要将盖拧紧存放，否则空气中的二氧化碳会进入溶液，形成碳酸，中和溶液 B 中的碱，降低其效率。如果溶液 B 颜色不是蓝色，则表示变质，应该弃之不用并且跟厂家联系。

7. 冰上放置不超过 5 分钟。注意：冰上放置不要超过 5 分钟，否则质粒 DNA 会有碱损伤。
8. 加入 350 μL 冰上预冷的革兰氏阳性细菌质粒 DNA 纯化溶液 C（下面简称溶液 C），温和反复颠倒 4-6 次，溶液将变成无色，将有白色絮状沉淀产生。
9. 冰上放置至少 5 分钟让质粒 DNA 复性。不能短于 5 分钟，一般 10 分钟。
10. 12,000 g 离心 3 分钟，小心将上清液转移到离心吸附柱中。由于此时的溶液比重较大，部分絮状物悬浮在上清液中属正常现象，吸取上清时避开这些悬浮物即可。如果此步的离心在 4℃ 进行，可减轻沉淀物漂浮。
11. 静置 2 分钟以让质粒 DNA 与离心吸附柱充分结合。
12. 室温 12,000 g 离心 1 分钟，弃收集管中的废液。
13. 加入 500 μL 的通用洗柱液到离心吸附柱中，室温 12,000 g 离心 1 分钟，弃收集管中废液。注意：通用洗柱液中含乙醇，每次用后需要将盖拧紧存放，否则乙醇会挥发。
14. 重复上步 1 次。
15. 室温 12,000 g 离心 1 分钟，甩干残留液体。此步不能省略，否则残留乙醇会影响 DNA 的后续使用（如残留乙醇使 DNA 溶液在电泳上样时不能沉淀到加样孔中）。
16. 将离心吸附柱置于一个新的 1.5 mL 塑料离心管中，加入 30-100 μL 65-80℃ 预热的 DNA 洗脱液（基因组 DNA 专用），室温放置 2 分钟。
17. 室温 12,000 g 离心 1 分钟，离心管底溶液即质粒 DNA 溶液。